

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 19, 1981, pp. 195–201

Über ein ^{125}I -Thyroninderivat hoher spezifischer Aktivität und radiochemischer Stabilität (Pseudo- T_4)¹⁾

Von L. Bölke, H. Herzmann und G. Vormum

Aus dem Zentralinstitut für Isotopen- und Strahlenforschung der Akademie der Wissenschaften der DDR,
Bereich Strahlenquellen und Nuklearpharmaka, Berlin-Buch

(Eingegangen am 26. September 1979/6. Mai 1980)²⁾

Zusammenfassung: Bei der Synthese ^{125}I -markierter Schilddrüsenhormone nach der Chloramin-T-Methode laufen unter den gewählten Reaktionsbedingungen elektrophile Substitution und Austauschreaktion an der 3'- und 5'-Position des phenolischen Ringes nebeneinander ab. Das Reaktionsprodukt ist in Abhängigkeit von der spezifischen Aktivität der zur Markierung verwendeten ^{125}I -Lösung ein Gemisch aus mono- und diradioiodierten Thyroninderivaten. Durch den Zerfall eines ^{125}I -Atoms in doppeltmarkierten Thyroninderivaten wird der zweite radioaktive Substituent abgespalten. Bei Verbindungen, die strukturbedingt zwei in bezug auf die chemische Bindung gleichwertige Iodatome enthalten, liegt bei hohen spezifischen Aktivitäten auch ein hoher Anteil der Moleküle doppeltmarkiert vor. Solche Verbindungen sind radiochemisch aber instabil. Durch die Einführung eines inaktiven Bromatoms in eine der Substitutionspositionen von 3,5-Diiodthyronin und anschließende Markierung mit ^{125}I in der zweiten Position kann ein Pseudo- T_4 isoliert werden, das sich durch T_4 -ähnliche immunologische Eigenschaften, hohe spezifische Aktivität und radiochemische Stabilität auszeichnet und deshalb z. B. als Tracer zur Bestimmung von freiem T_4 vorgeschlagen wird.

A ^{125}I -thyronine derivative of high specific activity and radiochemical stability (pseudo- T_4)

Summary: Under the described reaction conditions for the synthesis of ^{125}I -labelled thyroid hormones by the chloramine-T method, electrophilic substitution of the phenolic ring at positions 3' and 5' is accompanied by an exchange reaction. The proportions of mono- and diiodo-thyronine derivatives formed in this reaction depend on the specific activity of the ^{125}I starting material. Doubly labelled molecules are far less stable than mono products, because the radioactive decay of one iodine atom is followed by destruction of the molecule itself, and the remaining iodine atom is released as I^- . In the case of thyroxine with two equivalent substitution positions, there is always a high yield of doubly labelled molecules. By using a thyronine derivative containing a non-radioactive bromine atom in one of the two ortho positions of the 3,5-diiodothyronine molecule, it was possible to produce a "pseudo- T_4 " of high specific activity and excellent radiochemical stability by radioiodination of the second position. The immunological properties resemble those of T_4 . This compound may be useful as a tracer for the determination of free T_4 .

Einführung

Für den direkten radioimmunologischen Nachweis der freien Schilddrüsenhormone T_3 ¹⁾ und T_4 in z. B. Ultrafiltraten oder Diffusaten von Sera sind radioaktiv markierte Tracer mit möglichst hoher spezifischer Aktivität und radiochemischer Stabilität erforderlich. Mehrere Arbeitsgruppen haben über Möglichkeiten der

Synthesen von markierten Schilddrüsenhormonen und Thyroninderivaten hoher spezifischer Aktivität berichtet (1–12 und 14). Hierbei wurde jedoch der geringen radiochemischen Stabilität doppeltmarkierter Thyroninderivate wenig Aufmerksamkeit gewidmet. Thyronine, die am phenolischen Ring nur ein ^{125}I -Atom enthalten (z. B. T_3), können in Abhängigkeit von der spezifischen Aktivität des zur Markierung verwendeten ^{125}I bis zur theoretisch maximalen spezifischen Aktivität markiert werden (s. Tab. 5). Sie zeichnen sich durch hohe radiochemische Stabilität aus. Sind am phenolischen Ring des Thyronin-Moleküls dagegen die beiden gleichberechtigten 3'- und 5'-Positionen durch ^{125}I substituiert (z. B. T_4 oder rT_3), wird durch den Zerfallsprozeß eines ^{125}I -Atoms ($t/2 = 60 \text{ d}$) offenbar die Bindung des zweiten

¹⁾ Abkürzungen: $\text{T}_0 = \text{L-Thyronin}$; $3\text{-T}_1 = 3\text{-Iod-L-thyronin}$; $3'\text{-T}_1 = 3'\text{-Iod-L-thyronin}$; $\text{T}_2 = 3,5\text{-Diiod-L-thyronin}$; $3,3'\text{-T}_2 = 3,3'\text{-Diiod-L-thyronin}$; $3',5'\text{-T}_2 = 3',5'\text{-Diiod-L-thyronin}$; $\text{T}_3 = 3,5,3'\text{-Triiod-L-thyronin}$; $\text{rT}_3 = 3,3',5'\text{-Triiod-L-thyronin}$; $\text{T}_4 = 3,5,3',5'\text{-Tetraiod-L-thyronin}$ (L-Thyroxin); $\text{BrT}_3 = 3'\text{-Brom-3,5,5'-triiod-L-thyronin}$ (Pseudo- T_4); $\text{BrT}_2 = 3'\text{-Brom-3,5-diiod-L-thyronin}$; $\text{Br}_2\text{T}_2 = 3',5'\text{-Dibrom-3,5-diiod-L-thyronin}$.

²⁾ Der Abdruck wurde auf Wunsch der Autoren zurückgestellt, um die Arbeit zusammen mit I. c. (13) zu publizieren.

^{125}I -Atome gelöst und ^{125}I Iodid als Verunreinigung nachweisbar. Bei T_4 bedingt also eine hohe spezifische Aktivität wegen der Gleichwertigkeit der 3'- und 5'-Position unter den gewählten Reaktionsbedingungen einen hohen Anteil an doppelmarkiertem Produkt²⁾. Das bedeutet, daß T_4 mit theoretisch höchster spezifischer Aktivität nach einer Halbwertszeit des zur Markierung verwendeten Iodisotops durch etwa 50% radioaktives Iodid verunreinigt ist.

Wir untersuchten deshalb, ob nach Einführung eines nicht radioaktiven und nicht durch Iod austauschbaren Substituenten in 3'- oder 5'-Position am phenolischen Ring von T_2 die Doppelmarkierung nach dem anschließenden Umsatz mit ^{125}I verhindert werden kann. Außerdem sollten die immunologischen Eigenschaften dieses Pseudo- T_4 gegenüber einem T_4 -Antiserum im Vergleich zu echtem T_4 möglichst erhalten bleiben. Als brauchbarer Substituent erwies sich Brom (13). Nach Bromierung von T_2 mit ^{82}Br konnte das isolierte Monobrom- T_2 mit Iod im Überschuß quantitativ zu $^{82}\text{BrT}_3$ umgesetzt werden. Eine ^{82}Br -Substitution durch Iod wurde nicht beobachtet. Aus inaktivem BrT_2 und ^{125}I hoher spezifischer Aktivität wurde ein monomarkiertes 3'-Brom-5'- ^{125}I -3,5-diiod-L-thyronin (Pseudo- T_4) hoher spezifischer Aktivität und ausgezeichneter radiochemischer Stabilität isoliert, das durch thyroxinanalogue immunologische Eigenschaften als Tracer z. B. zur Bestimmung von freiem T_4 angewendet werden kann.

Material und Methoden

3,5-Diiod-L-thyronin, 3,5,3'-Triiod-L-thyronin, L-Thyroxin, 3'-Brom-3,5-diiod-L-thyronin, 3',5'-Dibrom-3,5-diiod-L-thyronin, alle Firma Henning Berlin GmbH. Sephadex G 25 fine, Pharmacia GmbH, Frankfurt/Main. Heterogene Ionenaustauscherstreifen auf PVC-Basis, Zentralinstitut für Isotopen- und Strahlenforschung (DDR). Na^{125}I , spezifische Aktivität: 444–555 GBq/mg (12–15 Ci/mg), Zentralinstitut für Kernforschung, Świerk (Polen). Na^{82}Br , spezifische Aktivität: 37 GBq/g (1 Ci/g), Zentralinstitut für Kernforschung, Rossendorf (DDR). T_4 -Antisera, hergestellt durch 5malige Immunisierung von Kaninchen in 14-tägigen Abständen mit je 1 mg T_4 -Rinderserumalbumin-Konjugat 1 + 1 mit komplettem Freund'schen Adjuvans emulgiert. Alle übrigen Reagenzien waren von Merck Darmstadt.

^{82}Br -Markierung von T_2

10 mg T_2 in 0,5 ml NaOH, 0,1 mol/l, wurden mit 0,8 ml 1,2-Propandiol gemischt, mit 30 µl verd. Schwefelsäure auf einen pH-Wert von 7,5–8 eingestellt und mit 0,3 ml Phosphatpuffer, 0,1 mol/l, pH 7,5, versetzt. Nach Erwärmen auf 70–80 °C erfolgten die Zugaben von 0,5 ml Na^{82}Br , 25,68 MBq (0,694 mCi), und 50 mg Chloramin-T in 0,3 ml Phosphatpuffer, 0,1 mol/l. Die Reaktion wurde nach 30 s durch Zugabe von 50 mg festem Natriumdisulfit und 0,3 ml NaOH, 0,1 mol/l, abgebrochen.

Inaktive Iodierung von $^{82}\text{BrT}_2$

0,5 ml des säulenchromatographisch isolierten Mono- $^{82}\text{BrT}_2$ (4,8 µg), mit wenigen Mikrolitern verd. Schwefelsäure auf einen pH von 7,5–8 eingestellt, wurden mit 50 µl Phosphatpuffer,

0,1 mol/l, pH 7,5, versetzt und mit 1,7 µg Iodid in 20 µl Phosphatpuffer, 0,1 mol/l, pH 7,5, gemischt. Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von 50 µg Chloramin-T in 25 µl Phosphatpuffer, 0,1 mol/l, pH 7,5. Nach 30 s erfolgte Abbruch der Reaktion durch Zugabe von 100 µg Natriumdisulfit in 100 µl Wasser.

Iodierung von BrT_2 mit Na^{125}I

20 µg BrT_2 , gelöst in 200 µl NaOH, 1 mmol/l, wurden mit 100 µl Phosphatpuffer, 0,1 mol/l, pH 7,5, und mit 80 µl Na^{125}I , 762 MBq (20,6 mCi), spezifische Aktivität 521,7 GBq/mg (14,1 Ci/mg), gemischt und mit 50 µg Chloramin-T in 25 µl Phosphatpuffer, 0,1 mol/l, pH 7,5, für etwa 30 s zur Reaktion gebracht. Durch Zugaben von 100 µg Natriumdisulfit in 100 µl Wasser und 495 µl NaOH, 0,1 mol/l, erfolgte Abbruch der Reaktion.

Papierelektrophorese

Veronalpuffer, 0,1 mol/l, pH 8,6; Schleicher und Schüll-Papier 2043b, 12 V/cm über 45 min.

Thyroninderivate: 2–6 cm; Iodid bzw. Bromid: 12–14 cm Laufstrecke.

Papierchromatographie

System: Ameisensäure (910–950 g/kg); Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 1,2 mmol/l), Volumina 10 ml + 50 ml. Papier: Whatman Nr. 1; aufsteigend über 4 h nach eintägiger Kammer-sättigung.

R_F -Werte: $\text{T}_2 = 0,7$; $\text{T}_3 = 0,55$; $\text{T}_4 = 0,31$; $\text{BrT}_2 = 0,69$; $\text{Br}_2\text{T}_2 = 0,62$; $\text{BrT}_3 = 0,36$; J und Br = 0,85.

Gelchromatographie

Trennmittel: Sephadex G 25 fine; Gelbettmaße: 35 × 1,6 cm; Eluens: NaOH, 10 mmol/l; Elutionsgeschwindigkeit: 50–60 ml/h.

Für eine getrennte Auftragung von Eluens und radioaktiver Probe wurden zwei Schlauchpumpen durch Silikon-Kautschuk-Schlauchleitungen, einem Mehrweghahn und einem Adapter mit der Säule gekoppelt. Durch ein hochempfindliches Detektor-Schreiber-System wurde der Trennverlauf durch kontinuierliche Messung der radioaktiven Konzentration des Eluats verfolgt.

Radioimmunologische Untersuchung

50 pg [^{125}I] T_4 oder [^{125}I] BrT_3 und 400 µg Anilinnaphthalinsulfonsäure- NH_4 -Salz in 250 µl Tris-Pufferlösung, 0,1 mol/l, wurden mit 10 µl T_4 -freiem Serum und 100 µl T_4 -Antiserum 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Bestimmung der Immunreaktivität wurden die Antisera 1:100 und zur Beurteilung der Standardkurven je nach Titer 1:2500 bis 1:8000 mit Pufferlösung verdünnt. Zur Trennung des antikörpergebundenen und des freien Tracers wurde die Inkubationslösung mit 1,5 ml Pufferlösung verdünnt und je ein Ionenaustauscherstreifen hinzugefügt, 60 min auf einem Rotator bewegt und anschließend die Streifen entnommen. Die Menge an antikörpergebundenem Tracer wurde nach Messung der Radioaktivität in einem Bohrlochszintillationszähler und nach Subtraktion der unspezifischen Bindung (Testansatz ohne Antiserum) bestimmt.

Ergebnisse

Eine ^{82}Br -Markierung von T_2 erfolgte, um festzustellen, ob aus der Verbindung Brom durch Iod unter bestimmten Reaktionsbedingungen verdrängt wird. Bei nur teilweiser Substitution würde entsprechend diesem Anteil beim Umsatz von BrT_2 mit ^{125}I wieder doppelmarkiertes [^{125}I] T_4 mit geringer radiochemischer Stabilität entstehen. Zur Trennung des $^{82}\text{BrT}_2$, des $^{82}\text{Br}_2\text{T}_2$ und der nicht umgesetzten Anteile an ^{82}Br und T_2 wurde das Reaktionsgemisch über Sephadex G 25 fine säulenchro-

²⁾ Veröffentlichung über Substitutions- und Austauschreaktionen zur Synthese radiochemisch stabiler monomarkierter Thyroninderivate in Vorbereitung.

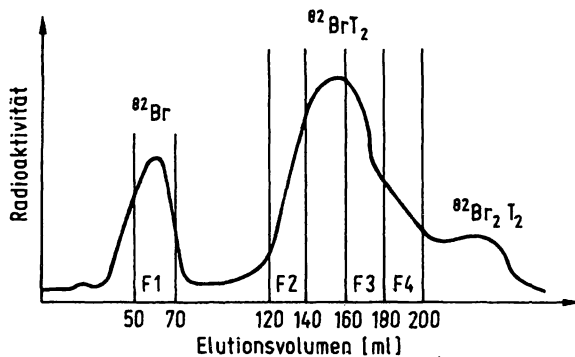


Abb. 1. Säulenchromatographische Trennung der Reaktionsprodukte nach ^{82}Br -Markierung von T_2 .

matographisch gereinigt (Abb. 1). Die prozentuale Verteilung des ^{82}Br auf die einzelnen Komponenten vor und nach Gelchromatographie wurde durch Papierelektrophorese und Papierchromatographie bestimmt und ist in Tabelle 1 zusammengestellt. Für die folgende inaktive Iodierung wurde ein Aliquot der Fraktion 2 mit 1% freiem Bromid verwendet. Die Konzentration an $^{82}\text{BrT}_2$ in der Fraktion 2 wurde durch Messung der Radioaktivität und unter Einbeziehung der spezifischen Aktivität des Na^{82}Br berechnet und betrug 9,2 mg/l. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Iodierung von 4,8 μg $^{82}\text{BrT}_2$ mit 1,7 μg Jodid (1,7facher Überschuß) zusammengefaßt. Durch den hohen Iodüberschuß wurde das $^{82}\text{BrT}_2$ quantitativ zum $^{82}\text{BrT}_3$ iodiert. Der unverändert gebliebene Anteil an ^{82}Br zeigt eindeutig, daß eine Substitution des Bromatoms durch Iod unter den gewählten Bedingungen nicht erfolgt. In einem Parallelversuch wurde dem inaktiven Iod eine Tracermenge ^{125}I zugefügt, um aus entstandenem $^{125}\text{I}]\text{T}_3$ bzw. $^{125}\text{I}]\text{T}_4$ eventuell nicht abgetrenntes inaktives T_2 zu erfassen. Beide Substanzen konnten nicht nachgewiesen werden. Daraus schließen wir, daß die Abtrennung des inaktiven T_2 quantitativ war.

Tab. 1. Prozentuale ^{82}Br -Verteilung in der Reaktionsmischung nach Markierung von T_2 mit ^{82}Br in den Fraktionen nach Gelchromatographie.

Substanz	Reaktionsmischung	Fraktion (Elutionsvolumen, [ml])			
		1 (50–70)	2 (120–140)	3 (160–180)	4 (180–200)
$^{82}\text{BrT}_2$	50,6	0,3	97,8	94,5	60,3
$^{82}\text{Br}_2\text{T}_2$	16,1	0,2	1,2	4,3	38,5
^{82}Br	33,3	99,5	1,0	1,2	1,2

Tab. 2. Prozentuale ^{82}Br -Verteilung vor und nach inaktiver Iodierung von $^{82}\text{BrT}_2$.

vor inaktiver Iodierung		nach inaktiver Iodierung	
$^{82}\text{BrT}_2$: 97,8	$^{82}\text{BrT}_3$: 97,7
$^{82}\text{Br}_2\text{T}_2$: 1,2	$^{82}\text{Br}_2\text{T}_2$: 1,2
^{82}Br	: 1,0	^{82}Br	: 1,1

Durch diesen Reaktionsverlauf waren die Voraussetzungen gegeben, inaktives BrT_2 mit ^{125}I hoher spezifischer Aktivität zu einem ausschließlich monomarkierten $^{125}\text{I}]\text{BrT}_3$ (Pseudo- T_4) umzusetzen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 2 und Tabelle 3 dargestellt. Für die Synthese wurde Na^{125}I mit einer spezifischen Aktivität von 521,7 GBq/mg (14,1 Ci/mg) verwendet. Die spezifische Aktivität des $^{125}\text{I}]\text{BrT}_3$ betrug 89 TBq/g (2404 Ci/g). Theoretisch könnten 110,6 TBq/g (2989,64 Ci/g) erreicht werden. Der Anteil von 1,2% $^{125}\text{I}]\text{T}_3$ ist vermutlich auf eine geringe Verunreinigung an T_2 im BrT_2 zurückzuführen und konnte säulenchromatographisch abgetrennt werden. Die Fraktion 4 wurde zu radioimmunologischen Untersuchungen und zur Stabilitätskontrolle verwendet. Als Vergleichssubstanz dienten: $^{125}\text{I}]\text{T}_4$ mit spezifischer Aktivität von 4,6–167,2 TBq/g (125–4520 Ci/g) und $^{125}\text{I}]\text{T}_3$ mit spezifischen Aktivitäten von 89–98 TBq/g (2400–2650 Ci/g).

Die Immunreaktivität des ^{125}I -markierten BrT_3 und - T_4 wurde mit vier verschiedenen T_4 -Antisera bei Antikörperüberschuß untersucht. Tabelle 4 zeigt die radiochemische Reinheit der eingesetzten Tracer, die jeweilige prozentuale Antikörperbindung und Immunreaktivität. Die Antisera Nr. 3 und Nr. 4 differenzieren nicht zwischen echtem T_4 und Pseudo- T_4 , während die Antisera Nr. 1 und Nr. 2 mit 89% bzw. 94% Bindung ausreichend hohe Kreuzreaktion zeigten. Unter Assay-Bedingungen bei entsprechender Verdünnung der Antisera (1:2500 bis 1:8000) wurden analoge Ergebnisse erhalten. Beide

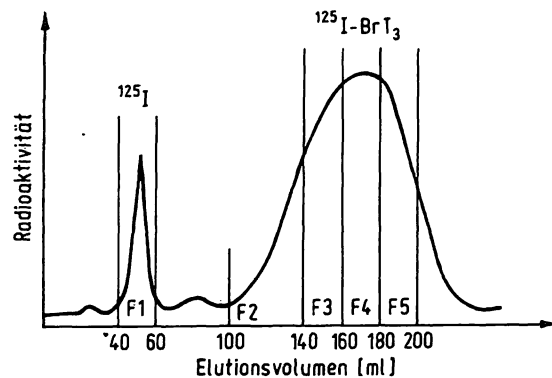


Abb. 2. Säulenchromatographische Trennung der Reaktionsprodukte nach ^{125}I -Markierung von BrT_2 .

Tab. 3. Prozentuale ^{125}I -Verteilung in der Reaktionsmischung nach ^{125}I -Markierung von BrT_2 und den Fraktionen nach Gelchromatographie.

Substanz	Reaktionsmischung	Fraktion (Elutionsvolumen, [ml])				
		1 (40–60)	2 (100–140)	3 (140–160)	4 (160–180)	5 (180–200)
Start		2,2	2,9	2,4	2,4	1,9
$^{125}\text{I-BrT}_3$	82,9	2,8	91,1	95,7	97,6	97,5
^{125}I	14,9	94,3	6,5	1,9	0,5	0,5

Tab. 4. Prozentuale Antikörperbindung bzw. Immunreaktivität von [^{125}I]T₄ und [^{125}I]BrT₃ (Pseudo-T₄) mit verschiedenen T₄-Antisera. Radiochemische Reinheit = 100% Immunreaktion.

T ₄ -Antiserum Nr.	^{125}I -BrT ₃			^{125}I -T ₄		
	Reinheit	Antikörperbindung	Immunreaktion	Reinheit	Antikörperbindung	Immunreaktion
1	97,5	86,8	89	88,5	77,9	88
2		91,7	94		85,0	96
3		96,5	99		86,7	98
4		97,5	100		88,1	99,5

Tracer lieferten mit den Antisera Nr. 3 und 4 identische Standardkurven, während die Antisera Nr. 1 und 2 entsprechend der geringeren Immunreaktivität parallel verschobene Kurvenverläufe zeigten.

Zur Beurteilung der radiochemischen Stabilität wurden die ^{125}I -markierten Thyroninderivate in wässrigem Ammoniumhydroxid, 0,7 mol/l, stabilisiert, bei 4 °C im Kühlschrank vor Licht geschützt gelagert und papierchromatographisch untersucht. Die Abhängigkeit der radiochemischen Stabilität von der spezifischen Aktivität und damit von dem Anteil an doppeltmarkierten Thyroxinmolekülen veranschaulicht die Abbildung 3. Das [^{125}I]BrT₃ zeigt die erwartete hohe radiochemische Stabilität der ausschließlich monomarkierten Thyroninderivate.

Diskussion

Die spezifische Aktivität der zur Markierung eingesetzten ^{125}I -Lösung bestimmt die der ^{125}I -markierten Thyroninderivate. Theoretisch hat reines ^{125}I eine spezifische Ak-

tivität von 644,2 GBq/mg (17,411 Ci/mg) bei einer Halbwertszeit von 60 Tagen, wenn die Berechnung nach

$$m = C \cdot A \cdot T \cdot 7,6579383 \cdot 10^{-9}$$

erfolgt (m = Masse in g; C = Aktivität in Ci; A = Atommasse; T = Halbwertszeit in Tagen).

In Tabelle 5 sind zur Veranschaulichung die Molekulargewichte inaktiv iodierter Thyroninderivate, die theoretisch möglichen Molekulargewichte nach Substitution des Wasserstoffs am phenolischen Ring durch ^{125}I mit 644,2 GBq/mg (17,411 Ci/mg) sowie die daraus resultierenden theoretisch möglichen spezifischen Aktivitäten zusammengestellt. Die spezifischen Aktivitäten betragen für ^{125}I -Thyroninderivate mit einem ^{125}I -Atom am phenolischen Ring 80,5 TBq/mmol (2176,38 Ci/mmol) und mit zwei ^{125}I -Atomen folglich 161 TBq/mmol (4352,75 Ci/mmol).

Durch die Gleichberechtigung der Substitutionspositionen des phenolischen Rings würde z. B. die Markierung von 1 Mol T₂ mit 1 Mol ^{125}I mit der maximal möglichen spezifischen Aktivität nach Abbildung 4 ablaufen. Die spezifischen Aktivitäten beider Hormone wären gleich dem theoretischen Maximum. T₃ ist in jedem Fall radiochemisch stabil, T₄ wäre instabil. Da völlig trägerfreie Lösungen von ^{125}I nicht erhältlich sind, hat dieser Reaktionsablauf jedoch nur theoretische Bedeutung.

Die spezifischen Aktivitäten käuflicher ^{125}I -Lösungen liegen etwa zwischen 185–555 GBq (5–15 Ci/mg). Da unter den gewählten Reaktionsbedingungen neben der elektrophilen Substitution der Wasserstoffatome durch Iodatome der Austausch von ^{125}I - und inaktiven Iodatomen erfolgt, ist die Menge an Trägeriodid die Summe

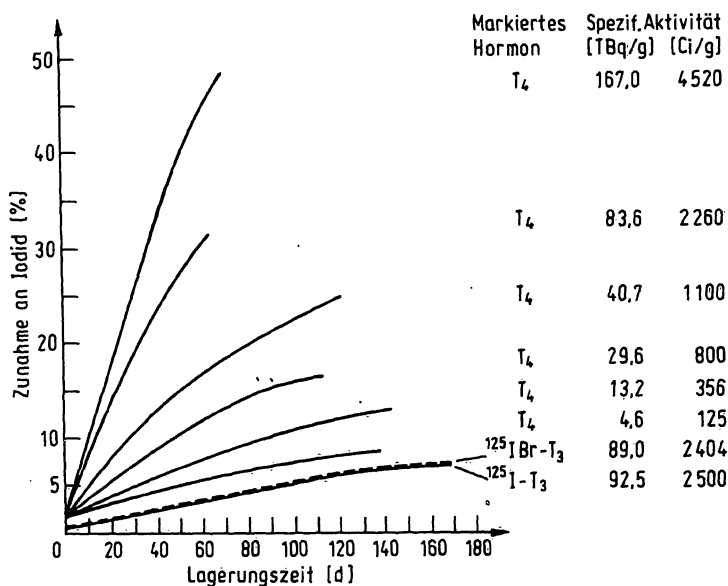


Abb. 3. Abhängigkeit der radiochemischen Stabilität von der spezifischen Aktivität ^{125}I -markierter T₄-Präparate im Vergleich zu [^{125}I]T₃ und [^{125}I]BrT₃.

Tab. 5. Molekulargewichte inaktiver und ^{125}I -markierter Thyroninderivate und theoretisch mögliche spezifische Aktivitäten.

Substanz	Molekulargewichte		Theoretisch mögliche spezifische Aktivität	
	mit stabilem Iod	1 ^{125}I -Atom 2 ^{125}I -Atome	TBq/g	Ci/g
T_0	273,291	—	—	—
3- T_1	399,188	—	—	—
3'- T_1	399,188	397,283	202,691	5478,148
T_2	525,084	—	—	—
3,3'- T_2	525,084	523,180	153,916	4159,897
3',5'- T_2	525,084	523,180 521,275	153,916 308,957	4159,897 8350,199
T_3	650,980	649,076	124,062	3353,036
r T_3	650,980	649,076 647,172	124,062 248,855	3353,036 6725,801
T_4	776,877	774,972 773,068	103,908 208,328	2808,327 5630,488
Br T_3	729,876	727,972	110,617	2989,641
Br T_2	603,980	—	—	—
Br $_2\text{T}_2$	682,876	—	—	—

aus inaktivem Iodid in den ^{125}I -Lösungen, dem am phenolischen Ring schon vorhandenen Iod bei Verwendung von T_3 , T_4 , 3'- T_1 , 3,3'- T_2 , 3',5'- T_2 oder r T_3 als Reaktionspartner und aus Iodkontaminationen der verwendeten Lösungen und Substanzen. Demzufolge laufen die Reaktionen nach Abbildung 5 ab.

Durch Variation des Mengenverhältnisses von T_2 zu Gesamtjodid kann der Reaktionsverlauf in Richtung T_3 oder T_4 gesteuert werden. Unterstöchiometrische Iodanteile oder größere Mengen von T_2 führen zur bevorzugten Bildung von T_3 , während erhöhte Iodmengen oder geringere Mengen von T_2 überwiegend T_4 ergeben,

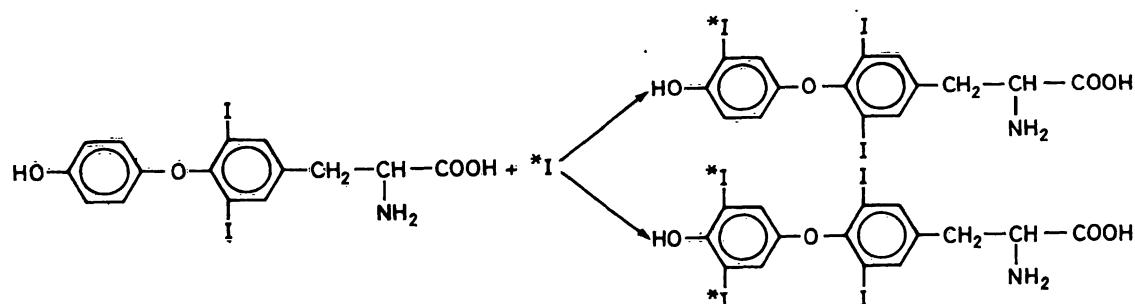
ohne die spezifischen Aktivitäten zu beeinflussen (14). Nur durch das Mengenverhältnis ^{125}I zu stabilem Iod wird die spezifische Aktivität bestimmt.

Über einen Zeitraum von mehr als 3 Jahren untersuchten wir die radiochemische Stabilität von [^{125}I] T_4 mit unterschiedlicher und von [^{125}I] T_3 mit hoher spezifischer Aktivität (s. Abb. 3). Es wurde beobachtet, daß durch den Zerfall eines radioaktiven Iodatoms in doppeltmarkiertem [^{125}I] T_4 in vitro kein radioaktives T_3 entsteht. Offenbar wird das zweite Iodatom abgespalten, denn es ist als radioaktives Iodid nachweisbar. Der Ablauf dieses Vorgangs ist im einzelnen noch unklar. Wir halten es für möglich, daß dieser Prozeß u. a. durch das um Zehnerpotenzen unterschiedliche Energieniveau zwischen chemischer Bindungsenergie und freierwerdender Energie bei der Kernumwandlung zu erklären sein könnte.

Ist dagegen nur eine Position am phenolischen Ring durch ^{125}I substituiert, die andere nicht oder durch ein inaktives Iodatom, so wird zwar durch die Kernumwandlung des ^{125}I -Atoms der gleiche Prozeß ablaufen, allerdings ist in diesem Fall der abgespaltene zweite Substituent nicht radioaktiv. Die radiochemische Reinheit monomarkierter ^{125}I -Thyroninderivate bleibt durch den Zerfallsprozeß des radioaktiven Iodatoms unberührt.

Eine schnelle Deiodierung doppeltmarkierter Moleküle durch vermehrte Autoradiolyse konnten wir im Gegensatz zu anderen Autoren (14) nicht beobachten. Nach Gamma-Bestrahlung von [^{125}I] T_3 - und [^{125}I] T_4 -Präparaten mit einer Dosis, die der Gesamtdosis der Eigenstrahlung des ^{125}I in den Hormonen bis zum völligen Zerfall entsprach, wurde keine nennenswerte Iodabspaltung festgestellt. Außerdem müßte sich die Autoradiolyse auch durch verstärkte Deiodierung von [^{125}I] T_3 -Präparaten mit hoher spezifischer Aktivität bemerkbar machen, was bei sachgemäßer Lagerung (4 °C, alkalisch, vor Licht geschützt) mit etwa 3% nach 60 Tagen auch nur in geringfügigem Umfang eintritt.

Um die unerwünschte Doppelmarkierung bei der Synthese von [^{125}I] T_4 mit hoher spezifischer Aktivität auszuschließen, lag der Gedanke nahe, einen inaktiven

Abb. 4. Reaktionsverlauf nach Umsatz von 1 Mol T_2 und 1 Mol ^{125}I (*I) mit theoretisch möglicher spezifischer Aktivität.

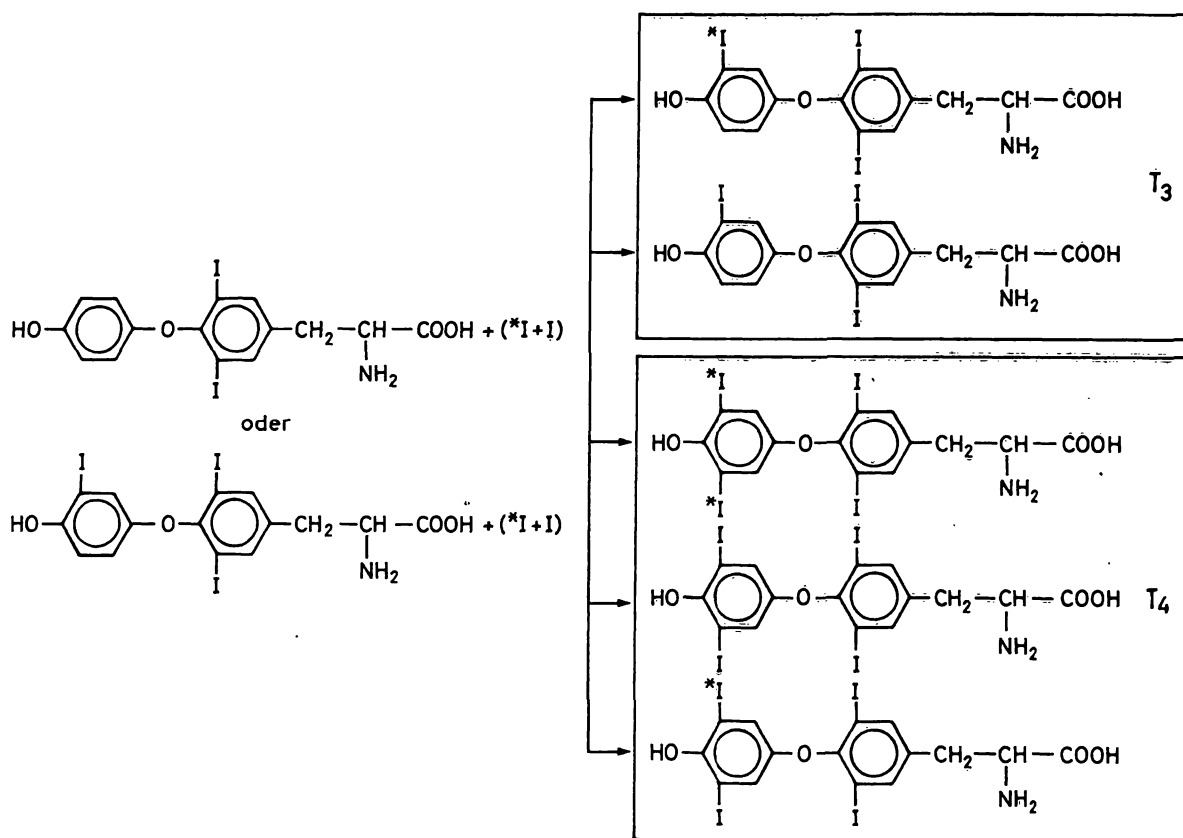


Abb. 5. Praktischer Reaktionsverlauf nach Umsatz von T_2 oder T_3 mit ^{125}I (*I).

Substituenten in eine Position des phenolischen Rings von T_2 zu fixieren und die zweite Position mit ^{125}I hoher spezifischer Aktivität zu substituieren. Voraussetzung war, daß der inaktive Substituent nicht durch Iod ausgetauscht wird und daß die immunologischen Eigenschaften im Vergleich zu echtem T_4 möglichst wenig verändert werden. Als geeigneter Substituent erwies sich Brom (13). Die Synthese von 3'-Brom-5'- ^{125}I -iod-3,5-diod-L-thyronin ($[^{125}\text{I}]\text{BrT}_3$ oder Pseudo- T_4) aus BrT_2 und ^{125}I mit hoher spezifischer Aktivität verläuft nach Abbildung 6.

Auch unter diesen Bedingungen wird die spezifische Aktivität des ^{125}I -Pseudo- T_4 durch das Mengenverhältnis von radioaktivem Iod zu inaktivem Iod bestimmt.

Mit käuflichen ^{125}I -Lösungen erreichten wir Werte von 85–96 TBq/g (2300–2600 Ci/g). Die radiochemische Stabilität ist durch das inaktive Bromatom am phenolischen Ring des Pseudo- T_4 ebenso hoch wie die des $[^{125}\text{I}]\text{T}_3$. Die immunologischen Eigenschaften sind dem echten T_4 sehr ähnlich. Mit T_4 -Antisera ermittelten wir Kreuzreaktionen von 85–100%. Die Immunreaktivität markierter Schilddrüsenhormone und Pseudo- T_4 korreliert eng mit der radiochemischen Reinheit. Aus Abbildung 3 kann demzufolge durch Differenzbildung zu 100% die entsprechende immunologische Reaktivität der aufgezeigten Präparate in Abhängigkeit von der Lagerungszeit abgelesen werden. Nach einer Halbwertszeit z. B. ist die Immunreaktivität von $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ -Lösungen mit 74 TBq/g (2000 Ci/g) bereits um etwa 30%

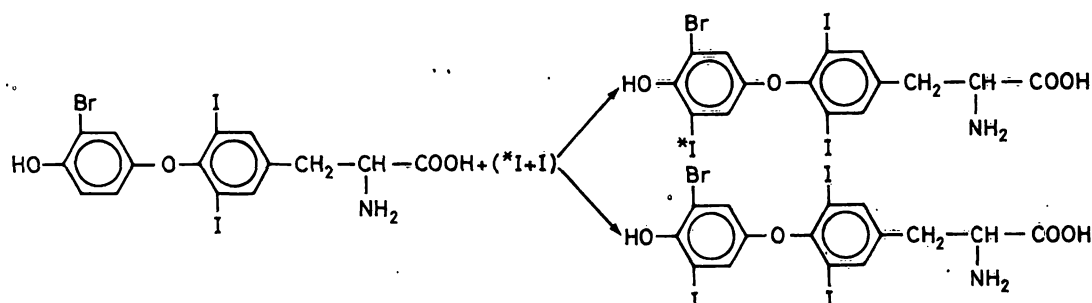


Abb. 6. Synthese von $[^{125}\text{I}]\text{BrT}_3$ aus BrT_2 und ^{125}I (*I) hoher spezifischer Aktivität.

vermindert, während [^{125}I] T_3 - und [^{125}I] BrT_3 -Präparate mit entsprechenden spezifischen Aktivitäten in dieser Zeit noch zu etwa 96% immunologisch aktiv sind.

^{125}I -markiertes 3'-Brom-3,5,3'-triiod-L-thyronin, aus BrT_2 und trägerarmen ^{125}I hergestellt, bietet durch hohe spezifische Aktivität und ausgezeichnete radiochemische Stabilität die besten Voraussetzungen, als

Tracer für einen sehr empfindlichen Radioimmunoassay zur Bestimmung von z. B. freiem T_4 eingesetzt zu werden.

Danksagung

Herrn Dr. H. Rokos, Firma Henning Berlin GmbH, danken wir für die Bereitstellung der bromsubstituierten Thyronine.

Literatur

1. Kochupillai, N., Yalow, R. S. & Solomon, A. (1977), The Endocrine Society, 59. Meeting, Chicago, June 8–10.
2. Weeke, J., Ørskov, H. (1973), Scand. J. Clin. Lab. Invest. 32, 357–360.
3. Nakamura, Y., Chopra, I. J. & Solomon, D. H. (1977), J. Nucl. Med. 18, 1112–1115.
4. Faerch, T. (1976), Clin. Chim. Acta 66, 137–139.
5. Kochupillai, N. & Yalow, R. S. (1978), Endocrinology 102, 128–135.
6. Morris, B. J. (1976), Clin. Chim. Acta 73, 213–216.
7. Toth, G. (1977), Radiochem. Radioanal. Lett. 29, 207–214.
8. Sorimachi, K. & Cahnmann, H. J. (1977), Endocrinology 101, 1276.
9. Kjeld, J. M. & Kuhu, S. F. (1975), Clin. Chim. Acta 61, 381.
10. Kim, J. & Kim, T. H. (1975), J. Korean. Nucl. Soc. 7, 127–133.
11. Dooper, E. & Burke, C. W. (1978), Clin. Chim. Acta 86, 51–59.
12. Reese, M. G. & Hales, R. H. (1978), J. Labell. Comp. 10, 555–568.
13. Rokos, H. & Steinmaus, H. (1981), diese Z. 19, 191–194 (vorhergehender Beitrag).
14. Ködding, R. & von zur Mühlen, A. (1975), Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 13, 563.

Lothar Bölke
Lindenberger Weg 70
DDR-1115 Berlin-Buch

